



GRADO EN BIOLOGÍA
Curso Académico 2023/24
Trabajo de Fin de Grado

**Evaluando la potencial respuesta a la selección en
Helianthemum squamatum en diversos escenarios de cambio
global**

Autor: Álvaro Sanz Martín

**Directores: Silvia Matesanz García, Marina Ramos Muñoz y
Mario Blanco Sánchez.**

Índice

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
3. Materiales y Métodos.....	7
3.1 Especie y área de estudio.....	7
3.2. Diseño experimental.....	9
3.3. Recogida y mediciones de rasgos funcionales.....	11
3.4. Análisis estadístico.....	13
4. Resultados.....	14
4.1 Variación fenotípica de las poblaciones entre tratamientos.....	14
4.2 Diferenciales de selección.....	16
4.3 Variación genética entre familias maternas.....	17
5. Discusión.....	18
6. Conclusiones.....	22
7. Agradecimientos.....	22
8. Bibliografía.....	23

1. Resumen

El cambio climático está amenazando a las poblaciones de plantas en todo el mundo al alterar los patrones de temperatura y precipitación, especialmente en áreas que ya experimentan estrés hídrico como es la cuenca mediterránea. Un ejemplo de poblaciones de plantas mediterráneas que habitan en ecosistemas semiáridos son los gipsófitos, plantas que presentan requisitos edáficos específicos y se desarrollan exclusivamente en suelos de yesos. La sequía es la principal presión selectiva sobre las poblaciones de gipsófitos y otras plantas mediterráneas. Sin embargo, en condiciones naturales, las poblaciones experimentan una combinación compleja de estrés abiótico y biótico más allá de la sequía. Evaluar los patrones de selección y la presencia de variación genética de los rasgos es necesario para comprender si un rasgo puede evolucionar por selección natural, es decir, si una población puede adaptarse a distintos ambientes. Aunque hay estudios que han evaluado las respuestas adaptativas a la sequía y sabemos que la potencial respuesta a la selección puede variar según las condiciones ambientales, carecemos de evidencia empírica de las respuestas adaptativas de las poblaciones de plantas en condiciones multivariadas complejas, ecológicamente significativas y realistas. Para ello, realizamos un experimento de jardín común con individuos de diferentes familias maternas de dos poblaciones diferentes, Lazagurría (Navarra) y Sorbas (Almería), del gipsófito estricto dominante *Helianthemum squamatum*. En este estudio, evaluamos cómo varían los patrones de selección y la variación genética cuantitativa de seis rasgos funcionales claves para entender la respuesta a la sequía (*fitness* reproductivo, inicio de floración, área foliar, área foliar específica, grosor y contenido de materia seca foliar), en cinco tratamientos experimentales resultantes de la combinación de distintos niveles de tres factores que simulan un gradiente de estrés (disponibilidad hídrica, calentamiento y competencia intraespecífica). Nuestros resultados mostraron que los individuos con una fenología adelantada tuvieron un mayor éxito reproductivo para ambas poblaciones en los diferentes tratamientos. Además, observamos que tanto la intensidad de la selección, como el valor adaptativo de rasgos foliares más adquisitivos aumentaron bajo condiciones de mayor estrés ambiental. Sin embargo, encontramos diferencias entre los tratamientos en los rasgos que presentaban variación genética cuantitativa en cada población y observamos una reducción de la expresión de la variación genética a medida que aumentó el nivel de estrés, lo que podría limitar la evolución bajo estas condiciones ambientales. Nuestro estudio muestra la importancia de conocer la potencial respuesta a la selección de los rasgos en ambientes más realistas con varios estreses simultáneos para predecir cómo las poblaciones de gipsófitos responderán ante el cambio climático.

2. Introducción

La variación global en las condiciones climáticas producidas por el cambio climático está afectando considerablemente a las poblaciones de plantas (Franks et al., 2014). En los próximos años se prevé que, unido a una creciente inestabilidad climática, continúe de manera progresiva el aumento de las temperaturas y la bajada de las precipitaciones (IPCC, 2022; Brunet et al., 2009; Amblar et al., 2017). En especial, estos cambios en los patrones climáticos se prevén más acusados en la región mediterránea que, sumado a la gran heterogeneidad espaciotemporal que ya presenta, afectarán negativamente al desarrollo de las poblaciones de plantas que habitan en esta zona (León-Sánchez et al., 2016; Blanco-Sánchez et al., 2022; Solé-Medina et al., 2022). Ante el progresivo crecimiento de la aridez en la cuenca mediterránea, las plantas pueden adaptarse a las nuevas condiciones mediante evolución adaptativa, ajustar su fenotipo a través de la plasticidad fenotípica o migrar a zonas más favorables para evitar extinguirse (Aitken et al., 2008; Matesanz & Valladares, 2014).

La evolución adaptativa (evolución por selección natural) provoca un cambio fenotípico de base genética en los rasgos de las poblaciones, y se ha visto que es un proceso clave para lidiar con los cambios ambientales como los provocados por el cambio climático (Hoffmann & Sgró, 2011; Franks et al., 2014). Primero, para que un rasgo evolucione por selección natural, tiene que existir variación fenotípica de dicho rasgo entre los individuos de una población. Segundo, es necesario que esta variación fenotípica esté asociada a una variación en algún componente de eficacia biológica, como la supervivencia o el éxito reproductivo (*fitness* reproductivo a partir de este momento). Finalmente, si estas diferencias fenotípicas ligadas a diferencias en eficacia biológica tienen base genética, el rasgo evolucionará por selección natural (Chevin et al., 2010). Por tanto, para saber cómo las poblaciones van a responder a los futuros cambios ambientales, es necesario conocer los patrones de selección, es decir qué rasgos y qué valores de rasgos determinan la eficacia biológica de los individuos, así como la presencia de variación genética para los rasgos adaptativos. En otras palabras, es necesario evaluar la potencial respuesta a la selección de los rasgos. Para evaluar qué rasgos están bajo selección, es decir, cuáles son adaptativos, los análisis de selección fenotípica son una herramienta muy útil, ya que nos permiten ver la relación entre un rasgo determinado y el *fitness* reproductivo de los individuos (Lande & Arnold, 1983; Phillips & Arnold, 1989). La selección natural es una fuerza dinámica, que puede variar en forma, dirección e intensidad dependiendo de las condiciones ambientales (Kingsolver & Pfennig, 2007). Por tanto, como los patrones de selección dependen

tanto de las condiciones ambientales como de la presencia de variación fenotípica, hay que evaluarlos en cada población y ambiente (Blanco-Sánchez et al., 2022).

Para lidiar con la sequía, la principal presión selectiva en los ecosistemas mediterráneos y semiáridos (Llinares et al., 2015; Ramírez-Valiente et al., 2021), las plantas han desarrollado adaptaciones funcionales que se corresponden con tres principales estrategias: escape, tolerancia y evitación. La estrategia de escape a la sequía se caracteriza por presentar altas tasas de uso de recursos, con valores altos de área foliar específica (SLA) y tasas fotosintéticas, y una fenología reproductiva temprana (Franks et al., 2011; Blanco-Sánchez et al., 2022). La estrategia de tolerancia a la sequía se relaciona con un uso conservador de los recursos, tasas de crecimiento lentas, valores bajos de SLA y altos valores del contenido de materia seca de las hojas (LDMC) (Pérez-Ramos et al., 2013; Blumenthal et al., 2020). Por último, la estrategia de evitación de la sequía tiene características relacionadas con la reducción de la transpiración (elevado grosor foliar) o con el desarrollo de raíces profundas para mantener la hidratación de los tejidos (Kooyers, 2015; Blumenthal et al., 2020).

Aunque la sequía es la principal presión selectiva en la región mediterránea, en la naturaleza las plantas están expuestas a una combinación de presiones selectivas que actúan de manera simultánea, como el calentamiento y la competencia (Escudero et al., 1999; León-Sánchez et al., 2016). De manera muy importante, la presencia de otros estreses simultáneos puede modificar los patrones de selección cuantificados bajo condiciones de estrés hídrico, por lo que la respuesta a la selección no se puede extrapolar a partir de los resultados de experimentos que evalúan sólo un factor ambiental. Por ejemplo, estudios previos han concluido que presentar hojas más esclerófilas es adaptativo en condiciones de sequía (Blumenthal et al., 2020), ya que hojas más duras y gruesas minimizan la pérdida de agua y controlan la transpiración (Ramírez-Valiente et al., 2011). Aunque en condiciones de sequía puede ser adaptativo tener un fenotipo más conservador y un uso de recursos más moderado, en presencia de otro estrés simultáneo como la competencia, podría ser adaptativo presentar hojas menos esclerófilas para crecer más rápido que el competidor. Por otra parte, la presencia de variación genética cuantitativa también puede variar entre poblaciones y ambientes (Ramírez-Valiente et al., 2011; Solé-Medina et al., 2022). En un escenario con fuertes cambios ambientales, presentar una mayor variación genética aumentará las probabilidades de supervivencia de las poblaciones, debido a que las permitirá continuar más cerca de su óptimo fenotípico (Chevin et al., 2010). Realizar análisis de variación genética entre familias maternas nos permite ver si la variación fenotípica de los

rasgos tiene base genética. De esta forma, podremos evaluar si los rasgos adaptativos tienen potencial evolutivo para evolucionar por selección natural. Aunque evaluar los patrones de selección y la presencia de variación genética cuantitativa en ambientes realistas y multivariados es necesario para predecir las respuestas de las poblaciones de plantas al cambio climático, aún desconocemos cómo varía la potencial respuesta a la selección en presencia de estreses simultáneos. Aumentar el número de estudios puede ser clave para la conservación y protección de las poblaciones naturales de la región mediterránea (Franks et al., 2014), en especial, de aquellos ecosistemas que ya presentan condiciones ambientales duras.

En la región mediterránea, un ejemplo particular son los ecosistemas de yesos, los cuales se encuentran principalmente ligados a zonas semiáridas (Escudero et al., 1999). En la Península Ibérica, los afloramientos de yesos representan el 7,2% de su superficie total, de la cual un 60% pertenece a la mitad oriental. Sus suelos presentan unas condiciones físico-químicas muy singulares, como un fuerte desequilibrio químico causado por su alto contenido en magnesio y azufre, bajo contenido en materia orgánica y nitrógeno, o la costra dura que se forma en superficie (Mota et al., 2011). La vegetación de estos ecosistemas está formada por una gran diversidad de caméfitos de vida corta de pequeño porte con una distribución parcheada entre la que se observa una costra biológica (Maestre et al., 2011). En estos ecosistemas se encuentran los gipsófitos estrictos, especies que crecen exclusivamente en este tipo de suelos (Aragón & Escudero, 2008). Unido al cambio climático, encontramos a la fragmentación del hábitat como dos de las principales amenazas en estos ecosistemas (Escudero et al., 2015). Estos suelos están fragmentados de manera natural, ya que se encuentran inmersos en otro tipo de sustratos en los que afloran siguiendo una distribución en forma de islas (Matesanz et al., 2018). Además, las prácticas humanas, principalmente ligadas a la intensificación de la agricultura, han aumentado la fragmentación natural de estos suelos (Matesanz et al., 2019). Por otro lado, la especialización al yeso ha promovido la evolución de una dispersión limitada, ya que las condiciones más favorables suelen encontrarse en las proximidades de cada planta materna (Schenk, 2013). Debido a esto, los gipsófitos suelen carecer de mecanismos dispersivos efectivos a larga distancia, lo que resulta en una gran concentración de semillas bajo estas plantas (Escudero et al., 2015). Si a esto se le suman los efectos de la fragmentación antrópica y natural, se limita mucho su capacidad de migración (Matesanz et al., 2019). En el marco global en el que nos encontramos, nuestro estudio es clave para conocer el potencial de respuesta mediante evolución adaptativa de las poblaciones de gipsófitos en el futuro, además de aumentar nuestros conocimientos sobre estos ecosistemas, los cuales han sido catalogados

como una prioridad de conservación por la Unión Europea (Council of the European Union, 1992; Mota et al., 2011). De esta forma se podría minimizar la futura pérdida progresiva de biodiversidad en estos ecosistemas, lo que lo vincula directamente con el Objetivo de Desarrollo Sostenible 15: Vida de ecosistemas terrestres.

Para evaluar cómo varía la potencial respuesta a la selección entre poblaciones en ambientes multivariados, realizamos un experimento de jardín común, el cual nos permitió someter a todas las plantas a diferentes ambientes experimentales. El experimento contó con plantas de diferentes familias maternas de dos poblaciones con condiciones contrastadas, en las que cuantificamos los patrones de selección y la variación genética existente en cinco rasgos funcionales diferentes: *fitness* reproductivo, inicio de floración, área foliar, área foliar específica, grosor y contenido de materia seca foliar. La especie de estudio es *Helianthemum squamatum*, un gipsófito dominante de la Península Ibérica. Sabiendo que la disponibilidad hídrica es la principal fuerza selectiva, como objetivo general de este estudio evaluamos cómo los patrones de selección y la presencia de variación genética a la sequía se ven modificados por la presencia simultánea de competencia intraespecífica y calentamiento. En este estudio damos respuesta a las siguientes preguntas: a) ¿Qué rasgos están bajo selección en cada tratamiento? ¿Difieren entre tratamientos? b) ¿La intensidad con que la selección actúa sobre los rasgos se ve modificada por la presencia de uno o más estreses? c) ¿Los patrones de selección difieren entre las dos poblaciones? d) ¿Qué rasgos presentan variación genética en cada tratamiento? ¿Difieren entre tratamientos y poblaciones? Hipotetizamos que tanto los patrones de selección, como la presencia de variación genética cuantitativa variarán entre tratamientos y poblaciones, lo que afectará a las respuestas en condiciones ambientales futuras.

3. Materiales y métodos

3.1. Especie y área de estudio

La especie de estudio es *Helianthemum squamatum* (L.) Dum. Cours. (Cistaceae), la cual es considerada una especie diagnóstica de vegetación de suelos de yesos (Aragón & Escudero, 2008). Esta especie se distribuye entre los 40 y los 900 metros de altitud, principalmente en el centro y mitad este de la Península Ibérica, con algunas poblaciones en el norte de África (Mota et al., 2011; Figura 1). Se trata de un caméfito perenne de color verdoso-amarillento de 10-40 cm de altura. Posee tallos erectos, escamosos y lignificados desde la base, con hojas lanceoladas planas, comúnmente algo carnosas (Castroviejo et al., 2012). Las flores, que permanecen unos

tres días abiertas desde su apertura, son hermafroditas con pétalos de color amarillo (3,5 y 5 mm de largo) y numerosos estambres. En las inflorescencias, la maduración de las flores se produce de forma asincrónica (Aragón & Escudero, 2008). Las inflorescencias tienen forma de corimbo y sus frutos son cápsulas con numerosas semillas en su interior. La producción de semillas varía en gran medida en función de las condiciones ambientales anuales (Blanco-Sánchez et al., 2022) y su dispersión se ve restringida al carecer de estructuras para la dispersión a larga distancia, solamente presentando una capa de mucílago que las ayuda a adherirse al suelo (Mota et al., 2011). Además, durante la germinación, esta capa ofrece un ambiente húmedo que ayuda a su asentamiento (Gutterman & Shem-Tov, 1996; Escudero et al., 1999). Presenta una vida más corta y una fenología más tardía que otros gipsófitos dominantes, tales como *Centaurea hyssopifolia* y *Lepidium subulatum*, que se extiende desde finales de mayo hasta mediados de agosto (Castroviejo et al., 2012; Blanco-Sánchez et al., 2022).

En julio de 2021 se recogieron en el campo semillas de dos poblaciones que presentaban un gran número de individuos, Sorbas (SOR, Almería) y Lazagurría (LAZ, Navarra). Estas dos poblaciones presentan condiciones ambientales contrastadas, que representan los extremos del gradiente climático donde se encuentra la especie en la Península Ibérica (Figura 1). Lazagurría (616 mm y 13,6°C) presenta una precipitación anual más alta y una temperatura media anual más baja que Sorbas (315 mm y 17,7°C; datos climáticos extraídos de CHELSA Bioclim v2.1 (Karger et al., 2017)). En cada población, se recolectaron semillas de 21 individuos adultos y reproductivos. Las semillas que procedían de una misma planta pertenecían a una misma familia materna, y las plantas de cada familia materna se consideraron medio hermanas debido al sistema de cruzamiento de la especie, ya que es mayoritariamente xenógamo (Aragón & Escudero, 2008). Debido a que *H. squamatum* presenta una escasa capacidad de dispersión, y para minimizar que los individuos estuvieran altamente emparentados, se escogieron individuos separados con una distancia de al menos dos metros. De esta forma, se consiguió obtener una mayor variabilidad genética en cada población. Para obtener las semillas de cada población, los frutos cosechados en el campo en cada planta materna fueron almacenados de forma individual en sobres de papel y fueron limpiados en el laboratorio posteriormente.

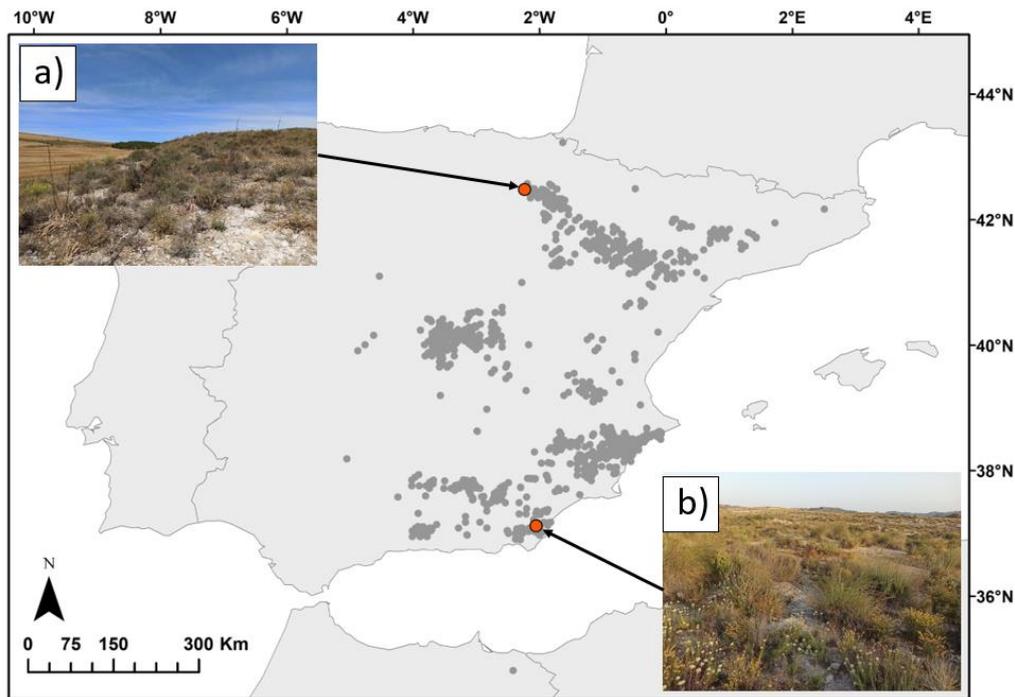


Figura 1. Distribución de *H. squamatum* en la Península Ibérica y norte de África (los puntos en gris representan la presencia de *H. squamatum* registrada en GBIF). a) Zona de recolección de las semillas de Sorbas, Almería. b) Zona de recolección de las semillas de Lazagurría, Navarra.

3.2. Diseño experimental

Antes de la siembra, se pesaron de manera individual en una microbalanza Mettler Toledo MX5 (precisión de 1 μ g; Mettler Toledo, Columbus, OH, EEUU) 10 semillas por familia materna, obteniendo así el peso promedio de las semillas de cada familia. La última semana de julio de 2021, se sembraron las semillas en macetas con sustrato de yeso de una cantera cercana (Yesos Ibéricos-Algiss S.A., Valdemoro, Madrid, España). A partir de este momento, ambas poblaciones se encontraron bajo las mismas condiciones ambientales en un jardín común en las instalaciones exteriores del Laboratorio de Cultivo de Organismos (CULTIVE) de la URJC (Móstoles, Madrid, España). Durante el primer año, se mantuvieron en una zona de aclimatación con condiciones alta disponibilidad hídrica, a capacidad de campo. En el segundo año de crecimiento, a comienzos de marzo de 2023, se trasladó a los individuos a la zona de experimentación, bajo las estructuras de exclusión de lluvia (Figura 2a), para comenzar con la aplicación de los tratamientos. Estas estructuras son necesarias para eliminar la lluvia natural y así poder implementar los tratamientos de disponibilidad hídrica robustamente. El experimento contaba con 105 estructuras y cada estructura contenía 10 macetas con las diferentes poblaciones y tratamientos.

El experimento contó con un total de 1050 plantas, provenientes de las 42 madres iniciales (21 por cada población). Los individuos experimentales fueron sometidos a cinco tratamientos diferentes y cada tratamiento contó con 5 hermanas procedentes de cada madre, por lo que tuvimos un total de 25 hermanas por madre (2 poblaciones x 21 madres x 5 hermanas x 5 tratamientos). Debido a que la sequía es el factor limitante en los ecosistemas asociados a suelos de yesos, se aplicaron 5 tratamientos experimentales centrados en la disponibilidad hídrica y que crearon un gradiente de estrés en los individuos experimentales: alta disponibilidad hídrica, sequía, sequía con competencia, sequía con calentamiento, y, sequía, calentamiento y competencia. En condiciones naturales, la humedad del suelo puede variar considerablemente a lo largo del año. Por un lado, en periodos de concentración de lluvias (primaveras lluviosas o años húmedos), el suelo puede encontrarse a capacidad de campo (~25 % de contenido hídrico del sustrato). En cambio, en épocas con menor cantidad de lluvias (primaveras secas o principios de verano), la cantidad de agua en el suelo puede verse reducida hasta la mitad (12-14 % de contenido hídrico; Blanco-Sánchez et al., 2023). Para simular dichas condiciones, en nuestro experimento se mantuvo el sustrato al 12,5% de su contenido hídrico en los tratamientos con sequía y al 25% en el tratamiento de alta disponibilidad hídrica. Para mantener la humedad de las macetas, a lo largo del experimento se utilizó un sistema de riego por goteo que controlaba la cantidad de agua suministrada en cada maceta (Figura 2c). Además, para comprobar la correcta implementación de los tratamientos, se midió aleatoriamente la humedad de 15 macetas de cada tratamiento 3 veces por semana con el medidor de humedad HH2 (Delta-T Devices, Cambridge, Reino Unido).

Helianthemum squamatum está sometido a otros estreses tanto abióticos como bióticos en condiciones naturales, entre los que destacan el aumento de las temperaturas y la competencia intraespecífica. Para simular escenarios de calentamiento se utilizaron estructuras de calentamiento u *open top chambers* (OTC; Figura 2b), que permitían aumentar la temperatura en 2,3 °C de media de las plantas de los tratamientos con calentamiento (Maestre et al., 2013). Estas estructuras presentaban una forma de tronco de una pirámide de base hexagonal con paredes transparentes de metacrilato, que permitían el paso de la luz. Para comprobar el correcto funcionamiento de las OTC, a lo largo del experimento se midieron la temperatura y humedad relativa del aire tanto dentro como fuera de las OTC, mediante el uso de sensores H21-USB (Onset Co., Bourne, MA, USA). Además, en condiciones naturales, los individuos de *H. squamatum* se encuentran formando parches densos de individuos conspecíficos, que suelen estar aislados y rodeados de un suelo cubierto de costra biológica compuesta por briófitos, algas,

líquenes y cianobacterias (Maestre et al. 2011; Matesanz et al., 2018). Para simular las densidades observadas en el campo, se introdujo otro individuo de la misma especie en las macetas de los tratamientos de competencia. Estas macetas estaban formadas por dos individuos: la planta focal y un competidor conespecífico. Los individuos competidores procedían de una población de la zona de Yebra (Guadalajara), la cual presenta unas condiciones climáticas correspondientes con la media de las condiciones climáticas (14,2 °C y 459 mm; precipitaciones y temperaturas medias anuales obtenidas con el modelo CHELSA (Karger et al., 2017)). De esta forma, se intentó homogeneizar la capacidad competitiva de los individuos competidores.

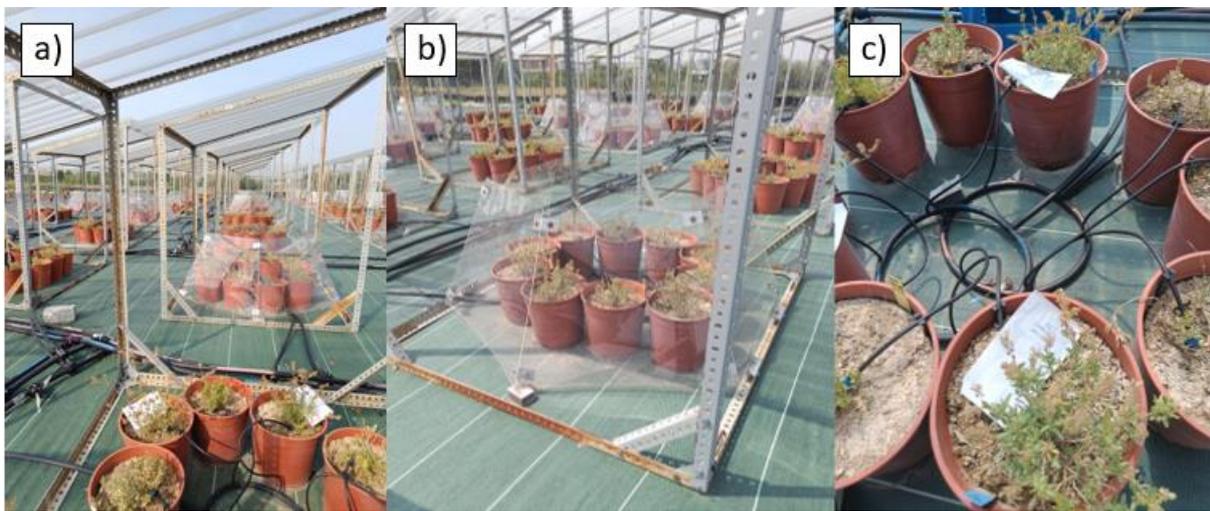


Figura 2. a) Estructuras de exclusión de lluvia; b) *Open top chambers* (OTC) con las macetas en su interior; c) Sistema de riego por goteo y sobres de papel nominativos en los que se recogieron las inflorescencias.

3.3. Recogida y mediciones de rasgos funcionales

Del 20 al 27 de junio de 2023, tras aproximadamente cuatro meses a partir del inicio de los tratamientos, se midió un amplio conjunto de rasgos funcionales en todos los individuos experimentales. En primer lugar, se recogieron cinco hojas representativas de cada planta. Se seleccionaron hojas verdes, totalmente desarrolladas y sanas. Se guardaron en bolsas de plástico, herméticamente cerradas, junto a un papel de filtro humedecido. Las hojas fueron almacenadas en frío y oscuridad para conseguir que las hojas estuvieran totalmente hidratadas. A la mañana siguiente, tras aproximadamente 12 horas, se secaron ligeramente las hojas para descartar el exceso de humedad y se recortó el peciolo en el laboratorio (Figura 3a). Luego, se obtuvo el peso turgente de las hojas con una microbalanza Mettler Toledo MX5 (Figura 3b) y se escanearon las hojas con un escáner Epson Perfection V370 (Seiko Epson Corporation,

Japón; Figura 3c), calculando así el área de las hojas mediante el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., California, USA). Luego, se calculó el área promedio de las cinco hojas turgentes de cada una de las plantas y se volvieron a guardar las hojas en sobres, esta vez de papel (Figura 3d). Más tarde, se introdujeron las hojas en la estufa a una temperatura de 60 °C durante una duración mínima de 72 horas para que se secan completamente y se pesaron las hojas en seco en la microbalanza anteriormente mencionada, para obtener el peso seco de las cinco hojas de cada planta.

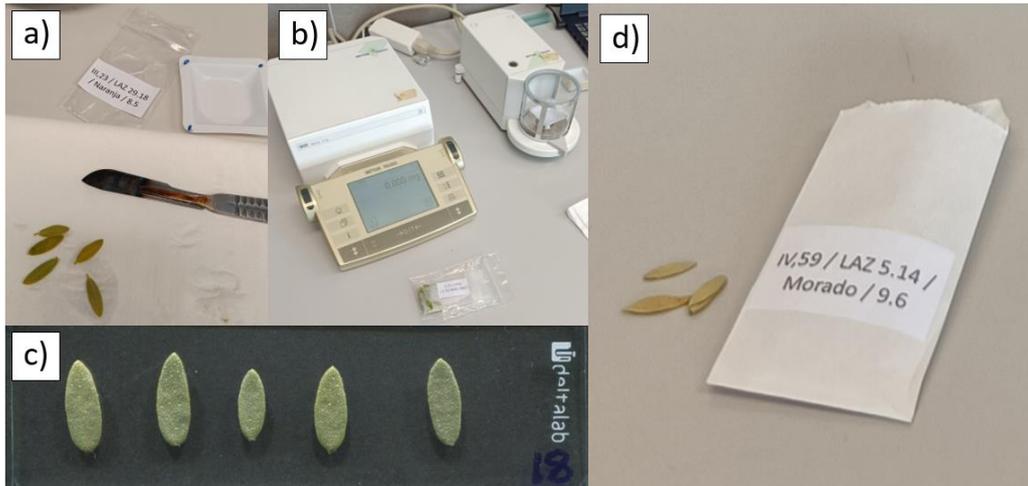


Figura 3. Procedimiento para caracterizar alguno de los rasgos foliares medidos. a) Descarte del exceso de humedad y corte de peciolo; b) Microbalanza de precisión utilizada para pesar las hojas turgentes; c) Hojas escaneadas; d) Sobre con hojas secas, después de haber pasado por el horno.

Con todos estos datos, a partir del peso turgente y el peso seco de las hojas se calculó el contenido de materia seca foliar o *Leaf Dry Matter Content* (LDMC, mg g^{-1}).

$$\text{LDMC} (\text{mg g}^{-1}) = \frac{\text{Peso turgente (mg)}}{\text{Peso seco (g)}}$$

Al tener el área foliar, que nos permite saber cómo de grande o pequeña es el área de las hojas, y el peso seco de las hojas, podemos calcular el área foliar específica o *Specific Leaf Area* (SLA, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$).

$$\text{SLA} (\text{cm}^2 \text{g}^{-1}) = \frac{\text{area foliar (cm}^2\text{)}}{\text{Peso seco (g)}}$$

El 30 de junio de 2023, finalizó el experimento con la recogida de la biomasa aérea y la biomasa reproductiva de las plantas. Con el fin de conocer el *fitness* reproductivo de cada planta, se calcularon dos rasgos integradores a nivel de cada planta, el número total de semillas y la masa

total de semillas. Para ello, primero se realizó el conteo de las inflorescencias viables y no viables (abortadas/depredadas) de cada planta. Luego, se recogieron tres inflorescencias maduras representativas de cada planta y se guardaron de forma individual en sobres de papel. Ya en el laboratorio, se contó el número de frutos por inflorescencia y el número de semillas viables que contenía cada una de las inflorescencias. Además, se pesaron de forma individual diez semillas viables de cada planta de forma aleatoria, y se calculó el peso medio de semilla para cada individuo. Para obtener el número total de semillas de cada planta, se calculó la media de semillas viables por inflorescencia y se multiplicó por el número de inflorescencias viables de la planta a la que pertenecían. Posteriormente, se multiplicó el peso medio de semilla por el número total de semillas, obteniendo así la masa total de semillas de cada planta.

3.4. Análisis estadístico

Debido a que la potencial respuesta a la selección puede variar entre poblaciones y condiciones ambientales, los datos se guardaron en diez bases de datos (una para cada población y tratamiento), y se analizaron de manera independiente. Se evaluaron los patrones de selección para conocer cómo actúa la selección natural en cada población y tratamiento. Para evaluar el potencial evolutivo de los rasgos, estos patrones de selección fueron complementados con estimas de variación genética para los rasgos en cada uno de los tratamientos. Primero, se relativizaron los valores de *fitness* reproductivo (el número total de semillas por planta), y se estandarizaron los rasgos funcionales, lo que es necesario para poder comparar la magnitud de la selección entre rasgos, condiciones ambientales y estudios (Kingsolver et al., 2012). Para relativizar los valores de *fitness* reproductivo, se dividió el valor de *fitness* de cada individuo por el valor medio de *fitness* para cada tratamiento. Para estandarizar los rasgos, se calcularon como el valor del rasgo menos la media del rasgo, dividido entre su desviación estándar. Los análisis de selección se realizaron mediante un modelo lineal mixto en el que se evaluó la relación entre el *fitness* reproductivo (variable dependiente) y cada uno de los rasgos (variables independientes), incluyendo como covariable el peso de semilla materno estandarizado y la identidad de la familia materna como factor aleatorio. Los diferenciales de selección miden la selección total sobre el rasgo, incluyendo la selección directa del rasgo y la selección indirecta ocasionada por los rasgos correlacionados (Kingsolver et al., 2012). Además, cuantifican la relación que existe entre el rasgo y el *fitness* reproductivo, proporcionándonos información sobre cómo varían los rasgos adaptativos en magnitud y dirección en condiciones ambientales contrastadas (Blanco-Sánchez et al., 2022). El diferencial de selección es la pendiente de esa relación, y la magnitud de la pendiente nos indica la fuerza con la que actúa dicha selección.

Para maximizar el ajuste de nuestros modelos, evaluamos la distribución que el *fitness* reproductivo tenía en cada tratamiento realizando histogramas con la función “hist”. Dependiendo de cómo fuera la distribución de la eficacia biológica, los diferenciales de selección fueron realizados con la función “glmer” (cuando el *fitness* reproductivo siguió una distribución gamma, con una distribución asimétrica a la derecha) o con “lmer” (distribución normal) del paquete “lme4”. En nuestro caso, se usó “lmer” para el tratamiento de alta disponibilidad hídrica y “glmer” para el resto de los tratamientos. Posteriormente, usando la función “summary”, se obtuvo el diferencial de selección (S), el error estándar y el p-valor para cada rasgo de cada población en cada ambiente. Tras esto, se realizó un análisis de variación genética entre las familias maternas para conocer el potencial evolutivo de los rasgos medidos. Para ello, se realizaron dos modelos para cada rasgo, utilizando el rasgo como variable dependiente; un modelo mixto incluyendo el peso de semilla materno como covariable y “madre” como factor aleatorio, y otro modelo en el cual se excluyó a la familia materna. Finalmente, para evaluar si la familia materna explicaba una proporción significativa de la varianza, lo que nos indicaría la presencia de variación genética para el rasgo, se compararon ambos modelos por *likelihood ratio test*, usando “ranova” del paquete lmerTest.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con R (*R Development Core Team*, 2019).

4. Resultados

4.1 Variación fenotípica de las poblaciones entre tratamientos

En primer lugar, se representaron las medias de cada uno de los rasgos para cada población y tratamiento (Figura 4). Los individuos de la población Lazagurría tuvieron un menor peso total de semillas en todos los tratamientos que los individuos de la población Sorbas (Figura 4a). Además, encontramos una reducción en el peso total de semillas a medida que se aumentaba el número de estreses simultáneos, observando la mayor diferencia entre el tratamiento con alta disponibilidad hídrica y el resto de los tratamientos con disponibilidad hídrica limitada. Respecto al inicio de floración, se observó una floración más temprana en la población Sorbas que en Lazagurría (Figura 4b). Encontramos que los tratamientos de alta disponibilidad hídrica, sequía y sequía con competencia tuvieron inicios de floración muy similares entre sí. En cambio, se observó un adelantamiento del inicio de la floración en el tratamiento de sequía con calentamiento y en el de sequía, calentamiento y competencia en ambas poblaciones. En general, los individuos de Lazagurría mostraron una mayor área foliar que los individuos de

Sorbas en la mayoría de los tratamientos (Figura 4c). Para ambas poblaciones, los individuos experimentales mostraron valores de área foliar mucho menores en los cuatro tratamientos con disponibilidad hídrica limitada en comparación con las condiciones de alta disponibilidad hídrica. No obstante, los valores de área foliar entre los cuatro tratamientos estresantes fueron similares. Por otro lado, se observó que las plantas de la población Lazagurría tuvieron una menor SLA que los individuos de la población Sorbas (Figura 4d). En ambas poblaciones, encontramos una reducción del SLA a medida que se aumenta el número de estreses. Por último, los individuos de la población Lazagurría mostraron un grosor foliar y un LDMC más altos que las plantas de la población Sorbas (Figura 4e y 4f). Además, observamos un aumento del grosor foliar y del LDMC a medida que aumentamos el número de estreses simultáneos para ambas poblaciones.

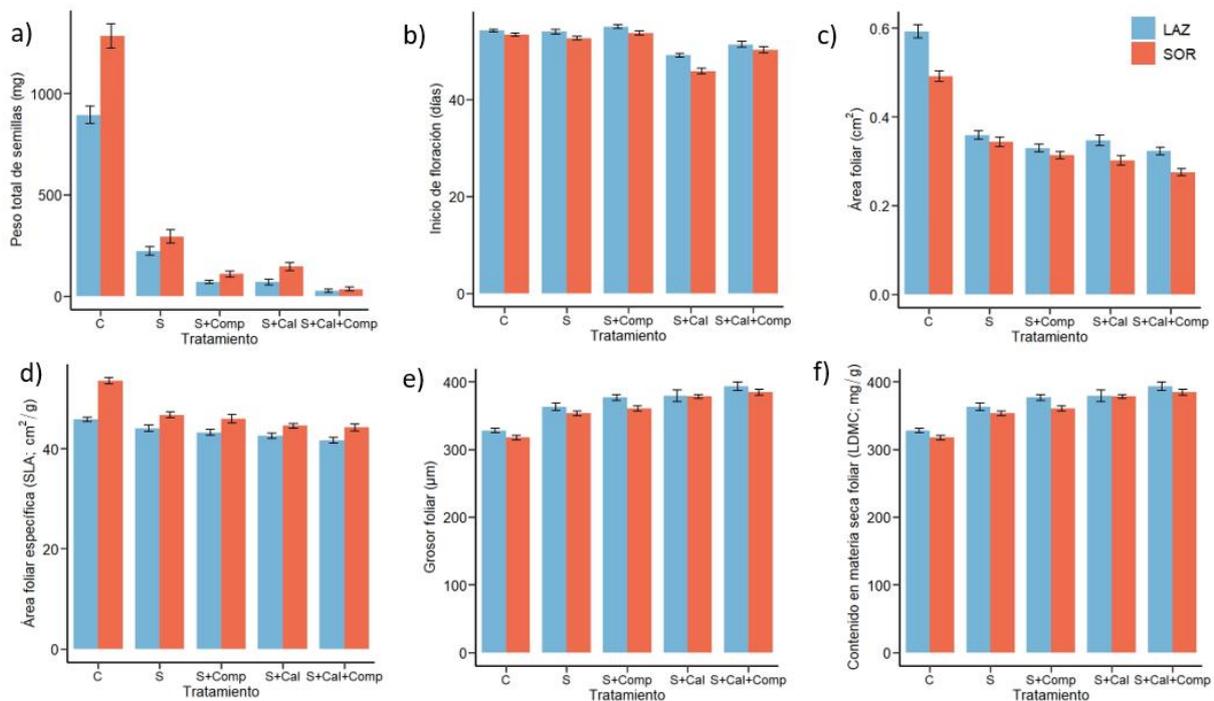


Figura 4. Valores medios y el error estándar para: a) peso total de semillas; b) inicio de floración; c) área foliar (LA); d) área foliar específica (SLA); e) grosor foliar y f) contenido en materia seca de la hoja (LDMC), para cada población (LAZ: Lazagurría y SOR: Sorbas) en cada tratamiento. C: Control; S: Sequía; S+Comp: Sequía y competencia; S+Cal: Sequía y calentamiento; S+Cal+Comp: Sequía, calentamiento y competencia.

4.2 Diferenciales de selección

Nuestros resultados mostraron diferenciales de selección significativos para ambas poblaciones en todos los tratamientos (Tabla 1). En concreto, bajo condiciones de alta disponibilidad hídrica y para ambas poblaciones, los individuos con una fenología adelantada mostraron un mayor *fitness* reproductivo, tal y como indica el diferencial de selección significativo y negativo (Tabla 1). En el tratamiento de sequía, los individuos de ambas poblaciones con fenologías tempranas también mostraron un mayor *fitness* reproductivo, y la intensidad de la selección fue mayor comparada con la intensidad en el tratamiento de alta disponibilidad hídrica, como indica la mayor magnitud del diferencial de selección. Además, en el tratamiento de sequía, mayores áreas foliares estaban bajo selección para Lazagurría y menores grosos foliares para Sorbas. Para ambas poblaciones, en el tratamiento de sequía con competencia observamos como la identidad y la magnitud de la selección fueron similares sobre el inicio de floración a la observada en el tratamiento de sólo sequía (Tabla 1). Sin embargo, en el tratamiento de sequía con calentamiento, se observaron diferencias entre los rasgos que se encuentran bajo selección al comparar ambas poblaciones. Al encontrarse bajo sequía con calentamiento, los individuos de la población Lazagurría que presentaban hojas de mayor tamaño, con un mayor SLA y un menor LDMC mostraron un mayor *fitness* reproductivo. En cambio, para los individuos de la población Sorbas fue adaptativo presentar una fenología más temprana y hojas de mayor tamaño bajo este ambiente (Tabla 1). Por último, bajo el ambiente con sequía, calentamiento y competencia, los individuos de ambas poblaciones con fenologías tempranas, mayores áreas foliares y menor LDMC mostraron mayor *fitness* reproductivo. Adicionalmente, fue adaptativo presentar un mayor SLA para los individuos de Sorbas en el ambiente con el mayor número de estreses. Además, bajo el ambiente con sequía, calentamiento y competencia, la intensidad de la selección fue mayor sobre el inicio de la floración y el LDMC, pero menor sobre el área foliar en la población Sorbas, en comparación con la población Lazagurría (Tabla 1).

Tabla 1. Diferenciales de selección (S') de los cinco rasgos funcionales en cada uno de los tratamientos con sus respectivos errores estándar para cada población. Niveles de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

	Control	Sequía	Sequía + Competencia	Sequía + Calentamiento	Sequía + Calentamiento + Competencia	
	S' (error estándar)	S' (error estándar)	S' (error estándar)	S' (error estándar)	S' (error estándar)	
Lazagurría	Inicio de floración	-0,128 (0,051)*	-0,413 (0,109)***	-0,404 (0,135)**	-0,325 (0,230)	-0,638 (0,273)*
	Área foliar	0,026 (0,046)	0,307 (0,115)**	0,026 (0,115)	0,399 (0,143)**	0,628 (0,173)***
	Área foliar específica	-0,019 (0,052)	0,106 (0,100)	-0,167 (0,116)	0,490 (0,156)**	0,282 (0,239)
	Grosor foliar	-0,037 (0,049)	-0,117 (0,101)	0,171 (0,142)	-0,147 (0,134)	-0,065 (0,252)
	Contenido de materia seca foliar	0,066 (0,050)	-0,135 (0,125)	0,078 (0,160)	-1,078 (0,269)***	-0,732 (0,289)*
Sorbas	Inicio de floración	-0,106 (0,049)*	-0,392 (0,116)***	-0,555 (0,154)***	-0,320 (0,140)*	-1,201 (0,240)***
	Área foliar	0,037 (0,045)	0,228 (0,142)	0,166 (0,172)	0,303 (0,131)*	0,394 (0,156)*
	Área foliar específica	0,011 (0,055)	0,248 (0,134)	0,053 (0,166)	0,142 (0,167)	0,646 (0,169)***
	Grosor foliar	-0,066 (0,046)	-0,317 (0,145)*	0,147 (0,210)	-0,080 (0,147)	-0,031 (0,213)
	Contenido de materia seca foliar	0,037 (0,053)	-0,133 (0,132)	-0,015 (0,158)	-0,118 (0,153)	-0,483 (0,176)**

4.3 Variación genética entre familias maternas

Nuestros resultados mostraron que la presencia de variación genética cuantitativa varió significativamente entre tratamientos y poblaciones (Tabla 2). En el tratamiento de alta disponibilidad hídrica y en el de sequía observamos que para ambas poblaciones el inicio de floración, que además se encontraba bajo selección, y el SLA mostraron variación genética en ambas poblaciones. En el tratamiento de sequía, el área foliar y el grosor foliar, que también estaba bajo selección, exhibieron variación genética en la población Sorbas. En el tratamiento de sequía con competencia, el inicio de floración, que estaba bajo selección, mostró variación genética en ambas poblaciones. En el tratamiento de sequía con competencia, el grosor foliar mostró variación genética en la población Sorbas. En cambio, en el tratamiento de sequía con calentamiento hubo grandes diferencias entre poblaciones. Mientras que en Sorbas el inicio de floración, que estaba bajo selección; el SLA y el grosor foliar exhibieron variación genética, en Lazagurría no se observó variación genética en ninguno de los rasgos estudiados (Tabla 2). Por último, en el tratamiento con sequía, calentamiento y competencia, los rasgos que mostraron variación genética en Sorbas fueron el SLA y el LDMC, los cuales estaban también bajo selección. En cambio, en Lazagurría, únicamente el área foliar mostró variación genética en el ambiente con mayor número de estreses, que además se encontraba bajo selección. Para ambas poblaciones, el número de rasgos con variación genética significativa se redujo a medida que se aumenta el nivel de estrés (Tabla 2).

Tabla 2. Razón de verosimilitud (LRT) que representa la presencia de variación genética de los cinco rasgos funcionales para cada uno de los tratamientos en cada población. Niveles de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

	Control	Sequía	Sequía + Competencia	Sequía + Calentamiento	Sequía + Calentamiento + Competencia	
	LRT	LRT	LRT	LRT	LRT	
Lazagurría	Inicio de floración	19,870***	4,213*	13,092***	0,278	1,498
	Área foliar	0,493	1,120	2,199	0,442	23,105***
	Área foliar específica	12,597***	4,294*	0,932	0,000	3,264
	Grosor foliar	1,887	0,000	0,000	1,306	0,189
	Contenido de materia seca foliar	1,500	2,639	0,577	0,000	0,000
Sorbas	Inicio de floración	29,931***	21,293***	9,026**	19,765***	0,726
	Área foliar	0,037	4,054*	0,523	0,435	0,000
	Área foliar específica	28,721***	11,931***	0,228	12,893***	4,624*
	Grosor foliar	3,523	15,919***	8,730**	7,468**	0,000
	Contenido de materia seca foliar	5,253*	1,499	0,227	0,775	7,502**

5. Discusión

Nuestros resultados mostraron cómo varía la potencial respuesta a la selección en ambientes realistas y multivariados en poblaciones de *H. squamatum*, lo que es necesario para comprender las futuras respuestas de las poblaciones de gipsófitos frente al cambio ambiental. De manera consistente, encontramos el valor adaptativo de una fenología reproductiva adelantada en todos los tratamientos y en ambas poblaciones, es decir, individuos que se reprodujeron antes tuvieron un mayor éxito reproductivo. Además, encontramos que presentar hojas menos esclerófilas con mayor área foliar, SLA más altos y valores más bajos de LDMC influyó positivamente en la eficacia biológica de los individuos en los tratamientos que simulaban combinaciones de un mayor número de estreses (sequía con calentamiento; sequía, competencia y calentamiento). En ambas poblaciones, tanto en la fenología como en los rasgos foliares, la intensidad de la selección fue mayor a medida que aumentó el grado de estrés. Sin embargo, la expresión de la variación genética para los rasgos adaptativos varió entre tratamientos y poblaciones, encontrando una reducción de la variación genética en ambas poblaciones según aumentó el nivel de estrés. En general, nuestros resultados mostraron cómo la respuesta potencial a la selección se vio afectada por la presencia de otros estreses, es decir, encontramos diferencias

en la respuesta al añadir competencia o calentamiento a los individuos con disponibilidad hídrica limitada. Por lo tanto, estos resultados son necesarios para predecir la respuesta potencial a la selección que tendrán las poblaciones de gipsófitos ante las futuras condiciones de cambio climático (Objetivo de Desarrollo Sostenible 15: Vida de ecosistemas terrestres).

Nuestros resultados mostraron consistentemente el valor adaptativo de una fenología reproductiva adelantada, y la intensidad de la selección fue mayor cuanto mayor nivel de estrés biótico y abiótico en ambas poblaciones. Además, ambas poblaciones también mostraron un adelantamiento de la fenología a medida que incorporamos estreses simultáneos. Esta fenología adelantada se corresponde con una estrategia de escape a la sequía (Franks et al., 2011; Kooyers, 2015; Blanco-Sánchez et al., 2022). Aunque inicialmente se pensaba que esta estrategia de escape a la sequía era más frecuente en especies anuales, estudios recientes han observado esta estrategia en especies sometidas a altos niveles de estrés. De hecho, el valor adaptativo de la fenología adelantada para escapar de la sequía ya se ha visto anteriormente en gipsófitos (Aragón et al., 2007; Blanco-Sánchez et al., 2022) y otras especies de zonas con clima mediterráneo (Stanton et al., 2000; Sherrard & Maherali, 2006; Franks, 2011; Nguyen et al., 2016). Esta estrategia permite a los individuos acabar el ciclo reproductivo antes de que ocurran las condiciones ambientales más limitantes y, con ello, conseguir una mayor eficacia biológica (Kooyers, 2015; Blanco-Sánchez et al., 2022). Alguna de las razones del valor adaptativo de presentar una floración más temprana puede ser la evitación de la competencia por la polinización (Munguía-Rosas et al., 2011). Otra razón podría estar relacionada con que los individuos con fenologías más tempranas pueden presentar periodos de floración más largos, lo que permite aumentar su producción de flores y semillas (Aragón et al., 2007).

Los patrones de selección y la intensidad con la que la selección actúa sobre los rasgos foliares fueron variables en función de las condiciones ambientales, encontrando una mayor intensidad de la selección y un mayor número de rasgos foliares adaptativos al aumentar la cantidad de estreses simultáneos (Tabla 1). En estudios previos se ha visto la importancia de los rasgos foliares estudiados como indicadores de las estrategias del uso de recursos, debido a que responden con sensibilidad a cambios en la disponibilidad hídrica y se ha visto su correlación positiva con la vida útil de las hojas (Cornelissen et al., 2003; Pérez-Harguindeguy et al., 2013). Bajo condiciones de disponibilidad hídrica limitada, encontramos bajo selección presentar mayores áreas foliares en Lazagurría y menores grosores en Sorbas, es decir, ambas poblaciones presentaron valores en los rasgos asociados con una estrategia adquisitiva (Blanco-Sánchez et

al., 2022). Estudios anteriores han visto el valor adaptativo de tener hojas más esclerófilas para minimizar la evapotranspiración (Ramírez-Valiente et al., 2011; Blumenthal et al., 2020). Sin embargo, en especies que soportan altos niveles de estrés, incluidos gipsófitos, se ha observado que los individuos con rasgos foliares más adquisitivos mostraron un mayor *fitness* reproductivo (Blanco-Sánchez et al., 2022; Blanco-Sánchez et al., 2023). Si comparamos los efectos del tratamiento de sequía con competencia con el tratamiento de solo sequía, observamos que la competencia no afectó a los patrones de selección. Por tanto, parece que la competencia no es una presión selectiva tan importante para esta especie. De hecho, se han observado efectos positivos de la presencia en las cercanías de individuos de la misma especie y altos grados de la sincronía de floración en la producción de semillas por planta en *H. squamatum* (Aragón et al., 2007). Los principales cambios en los patrones de selección se observaron al incorporar el calentamiento a la sequía, donde la mayoría de los rasgos foliares se encontraron bajo selección y, de nuevo, tener una hoja menos esclerófila con mayor área foliar y SLA resulta ser adaptativo. En ambientes con gran cantidad de estrés, presentar hojas menos esclerófilas confiere a los individuos una ventaja competitiva al aumentar su captura de luz y de carbono (Pérez-Ramos et al., 2013). Tener hojas de mayor tamaño podría ayudar a las plantas a presentar sistemas radiculares más extensos, con ello aumentando su búsqueda de agua (Pérez-Ramos et al., 2013). Además, en estudios anteriores se ha observado la selección para un mayor tamaño de las hojas en varias especies en condiciones con menor disponibilidad hídrica (Donovan et al., 2007). Contrariamente, los valores altos de SLA se han relacionado en otros estudios con especies de ambientes ricos en recursos (Poorter & De Jong, 1999), donde las plantas pueden realizar altas inversiones en la maquinaria foliar (Reich, 2014). Blumenthal et al. (2020) observó que seguir esta estrategia de escape de la sequía con un LDMC más bajo hace a los individuos más vulnerables frente a la herbivoría. Además, observó la relación de presentar un LDMC más bajo con bajas inversiones en las paredes celulares, menor dureza y mayor digestibilidad, pero con reducciones en los costos de carbono y, por ende, aumentos en el crecimiento. En resumen, nuestros resultados indicaron que los rasgos foliares determinan el *fitness* reproductivo de los individuos sólo bajo altos niveles de estrés. De hecho, la presencia de estreses simultáneos produjo la expresión de hojas con menor área foliar, tal y como se ha observado en estudios previos que han sometido a esta especie a condiciones de calentamiento (León-Sánchez et al., 2016).

En ambas poblaciones, encontramos patrones de selección bastante similares. No obstante, las diferencias entre poblaciones en los patrones de selección se acrecentaron en los tratamientos

que incluyeron sequía y calentamiento de manera simultánea (sequía con calentamiento; sequía, calentamiento y competencia). Al encontrarse las plantas en el ambiente con más estreses simultáneos, la intensidad de la selección fue mayor en Sorbas sobre las hojas menos esclerófilas y sobre una fenología más temprana que en Lazagurría. De forma similar al ambiente con mayor nivel de estrés, observamos estas diferencias entre poblaciones en la expresión fenotípica de los rasgos de la Figura 4. Los individuos de la población Sorbas mostraron una floración más temprana, valores más altos de SLA o valores de LDMC y área foliar más bajos que los observados en la población Lazagurría (Figura 4). En estudios previos se observó que, aunque existieran diferencias entre poblaciones en el inicio de floración o en el tamaño de las hojas en condiciones de estrés, la selección favoreció valores de los rasgos relacionados con una estrategia de escape de la sequía (Donovan et al., 2007). En otros estudios, se pudieron observar diferencias en los patrones de selección entre poblaciones en los tiempos de desarrollo o en la masa de las semillas (Ramírez-Valiente et al., 2021). A pesar de estas diferencias entre poblaciones, los resultados mostraron valores de los rasgos asociados a una estrategia de escape del estrés en ambas poblaciones, por lo que podríamos decir que, a nivel intraespecífico, ser adquisitivo es adaptativo.

En nuestro estudio también se analizó la variación genética existente entre familias maternas de cada una de las poblaciones, lo que es clave para conocer la capacidad que tendrán las poblaciones para adaptarse a las nuevas condiciones climáticas (Stanton et al., 2000; Niinemets, 2015). Para que los rasgos adaptativos evolucionen es necesaria la presencia de variación genética cuantitativa dentro de las poblaciones (Blanco-Sánchez et al., 2022). Sin embargo, sabemos que la evolución adaptativa podría verse limitada por una reducida variación genética ligada a la fragmentación que sufren estos ecosistemas (Matesanz & Valladares, 2014). Teniendo en cuenta que la selección pasada reduce la variación genética y fenotípica que vemos actualmente, podríamos suponer que las plantas de Sorbas, al tener una historia evolutiva en una zona con unas condiciones climáticas más estresantes, debería de tener una menor variación genética que Lazagurría. Al contrario de esto, se puede apreciar en nuestros resultados que la población Sorbas presentó una ligera mayor variación genética cuantitativa que la población Lazagurría en todos los tratamientos (Tabla 2). Nuestros resultados, que fueron similares a los observados por Matesanz et al. (2020) y por Blanco-Sánchez et al. (2023), mostraron variación genética significativa en ambas poblaciones, lo que nos indica que la reducción de la variación genética no es debida a selección pasada, sino a cómo el ambiente limita la expresión de la variación genética. El potencial evolutivo puede verse afectado por el estrés ambiental, debido

a que el ambiente influye en la variación fenotípica y en la eficacia evolutiva de los individuos (Stanton et al., 2000). En estudios anteriores se ha visto la gran importancia de las condiciones climáticas de cada población para determinar la variación genética intraespecífica de las especies mediterráneas (Solé-Medina et al., 2022; Blanco-Sánchez et al., 2024). En un escenario futuro de cambio climático, el tratamiento con mayor nivel de estrés (sequía, calentamiento y competencia) puede ser el ambiente más realista. En nuestros resultados podemos observar que, aunque la fenología adelantada se encontró bajo selección en el tratamiento más estresante, careció de variación genética cuantitativa significativa en ambas poblaciones. Esto nos sugiere que el potencial evolutivo de una fenología más temprana puede estar limitado en escenarios futuros. En cambio, encontramos que los rasgos foliares que se encontraban bajo selección (LA en Sorbas; SLA y LDMC en Lazagurría) también presentaban variación genética. Por lo tanto, para la adaptación futura de la especie, los rasgos foliares son los que presentan un mayor potencial evolutivo.

6. Conclusiones

Los patrones de selección mostraron el valor adaptativo de una fenología temprana en todos los tratamientos. Aunque encontramos que, a medida que aumentó la cantidad de estrés, los individuos de *H. squamatum* presentaron valores de rasgos foliares más propios de una estrategia conservadora, los análisis de selección mostraron que la selección favoreció los valores de los rasgos foliares relacionados con una estrategia adquisitiva del uso de recursos en ambas poblaciones. Además, encontramos variación genética cuantitativa significativa en ambas poblaciones. Sin embargo, observamos una reducción de la variación genética a medida que se aumentó el número de estreses simultáneos, posiblemente debido a que se vea limitada su expresión por el ambiente. Debido a la prioridad de conservación de los ecosistemas yesíferos en la Península Ibérica, es necesario analizar los patrones de selección de sus especies más representativas en ambientes que reflejen condiciones naturales futuras. El uso de ambientes multivariantes y realistas es clave para poder entender la respuesta a la selección que tendrán estas especies y, con ello, poder predecir las respuestas que tendrán al cambio climático.

7. Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Silvia Matesanz por la oportunidad que me ha regalado de poder participar en todo el proceso de este estudio. De igual manera, querría dar las gracias

a Marina Ramos y Mario Blanco, por todas las cosas que me han enseñado y por ayudarme tanto en este camino.

Por último, me gustaría dar las gracias a mi familia, en especial a Mónica Millán, por todo el apoyo que me han dado desde que comencé esta aventura.

8. Bibliografía

- Aitken, S. N., Yeaman, S., Holliday, J. A., Wang, T., & Curtis-McLane, S. (2008). Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications*, 1, 95 – 111.
- Amblar, M. P., Casado Calle, M. J., Pastor Saavedra, M. A., Ramos Calzado, P., & Rodríguez Camino, E. (2017). *Guía de escenarios regionalizados de cambio climático sobre España a partir de los resultados del IPCC-AR5*.
- Aragón, C. F., & Escudero, A. (2008). Mating system of *Helianthemum squamatum* (Cistaceae), a gypsophile specialist of semi-arid Mediterranean environments. *Botanica Helvetica* 118: 129–137.
- Aragón, C. F., Albert, M. J., Giménez-Benavides, L., Luzuriaga, A. L., & Escudero, A. (2007). Environmental scales on the reproduction of a gypsophyte: a hierarchical approach. *Annals of Botany*, 99(3), 519-527.
- Blanco-Sánchez, M., Franks, S. J., Ramos-Muñoz, M., Pías, B., Ramírez-Valiente, J. A., Escudero, A., & Matesanz, S. (2023). Contrasting adaptive trait variation in response to drought in two Mediterranean shrubs. *Environmental and Experimental Botany* 208: 105253.
- Blanco-Sánchez, M., Ramírez-Valiente, J. A., Ramos-Muñoz, M., Pías, B., Franks, S. J., Escudero, A., & Matesanz, S. (2024). Range-wide intraspecific variation reflects past adaptation to climate in a gypsophile Mediterranean shrub. *Journal of Ecology*.
- Blanco-Sánchez, M., Ramos-Muñoz, M., Pías, B., Ramírez-Valiente, J. A., Díaz-Guerra, L., Escudero, A., & Matesanz, S. (2022). Natural selection favours drought escape and an acquisitive resource-use strategy in semi-arid Mediterranean shrubs. *Functional Ecology* 36: 2289-2302.

- Blumenthal, D. M., Mueller, K. E., Kray, J. A., Ocheltree, T. W., Augustine, D. J., & Wilcox, K. R. (2020). Traits link drought resistance with herbivore defence and plant economics in semi-arid grasslands: The central roles of phenology and leaf dry matter content. *Journal of Ecology*, 108(6), 2336-2351.
- Brunet, M., Casado, M. J., de Castro, M., Galán, P., López, J. A., Martín, J. M., Pastor, A., Petisco, E., Ramos, P., Ribalaygua, J., Rodríguez, E., Sanz, I., & Torres, L. (2009). *Generación de escenarios regionalizados de cambio climático para España*. Agencia Estatal de Meteorología, Madrid. España.
- Castroviejo, S. (2012). *Flora iberica*. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Chevin, L. M., Lande, R., & Mace, G. M. (2010). Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS biology*, 8(4), e1000357.
- Cornelissen, J. H., Lavorel, S., Garnier E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D. E., Reich, P. B., Steege, H., Morgan, H. D., Heijden, M. G. A., Pausas, J. G., Poorter, H., & Poorter, H. (2003). A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian journal of Botany*, 51(4), 335-380.
- Council Directive 1992. 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. *Official Journal of the European Union* 206(7-50).
- Donovan, L. A., Dudley, S. A., Rosenthal, D. M., & Ludwig, F. (2007). Phenotypic selection on leaf water use efficiency and related ecophysiological traits for natural populations of desert sunflowers. *Oecologia*, 152, 13-25.
- Escudero, A., Palacio, S., Maestre, F. T., & Luzuriaga, A. L. (2015). Plant life on gypsum: a review of its multiple facets. *Biological Reviews*, 90(1), 1–18.
- Escudero, A., Somolinos, R. C., Olano, J. M., & Rubio, A. (1999). Factors controlling the establishment of *Helianthemum squamatum*, an endemic gypsophile of semi-arid Spain. *Journal of Ecology*, 87(2), 290-302.
- Franks, S. J. (2011). Plasticity and evolution in drought avoidance and escape in the annual plant *Brassica rapa*. *New Phytologist*, 190(1), 249-257.
- Franks, S. J., Weber, J. J., & Aitken, S. N. (2014). Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations. *Evolutionary Applications*, 7, 123–139.

- Gutterman, Y., & Shem-Tov, S. (1996). Structure and function of the mucilaginous seed coat of *Plantago coronopus* inhabiting the Negev Desert of Israel. *Israel Journal of Plant Sciences*, 44, 125-134.
- Hoffmann, A. A., & Sgrò, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470, 479-85.
- IPCC, 2022. Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Aleg.
- Karger, D., Conrad, O., Böhner, J., Kawohl, T., Kreft, H., Soria-Auza, R. W., Zimmermann, N. E., Linder, H. P., & Kessler, M. (2017). Climatologies at high resolution for the earth's land surface areas. *Scientific Data* 4:170122.
- Kingsolver, J. G., & Pfennig, D. W. (2007). Patterns and Power of Phenotypic Selection in Nature. *BioScience*, 57(7), 561–572.
- Kingsolver, J. G., Diamond, S. E., Siepielski, A. M., & Carlson, S. M. (2012). Synthetic analyses of phenotypic selection in natural populations: Lessons, limitations and future directions. *Evolutionary Ecology*, 26(5), 1101–1118.
- Kooyers, N. J. (2015). The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant science*, 234, 155-162.
- Lande, R., & Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 1210-1226.
- León-Sánchez, L., Nicolas, E., Nortes, P. A., Maestre, F. T., & Querejeta, J. I. (2016). Photosynthesis and growth reduction with warming are driven by nonstomatal limitations in a Mediterranean semi-arid shrub. *Ecology and Evolution* 6, 2725-2738.
- Llinares, J. V., Bautista, I., del Pilar Donat, M., Lidón, A., Lull, C., Mayoral, O., Shantanu, W., Boscaiu, M., & Vicente, Ó. (2015). Responses to environmental stress in plants adapted to Mediterranean gypsum habitats. *Notulae Scientia Biologicae*, 7(1), 37-44.
- Maestre, F. T., Bowker, M. A., Cantón, Y., Castillo-Monroy, A. P., Cortina, J., Escolar, C., Escudero, A., Lázaro, R., & Martínez, I. (2011). Ecology and functional roles of

- biological soil crusts in semi-arid ecosystems of Spain. *Journal of Arid Environments* 75, 1282-1291.
- Maestre, F. T., Escolar, C., de Guevara, M. L., Quero, J. L., Lázaro, R., Delgado-Baquerizo, M., Ochoa, V., Berdugo, M., Gozalo, B., & Gallardo, A. (2013). Changes in biocrust cover drive carbon cycle responses to climate change in drylands. *Global change biology*, 19(12), 3835-3847.
- Matesanz, S., & Ramírez-Valiente, J. A. (2019). A review and meta-analysis of intraspecific differences in phenotypic plasticity: implications to forecast plant responses to climate change. *Global Ecology and Biogeography*, 28(11), 1682-1694.
- Matesanz, S., & Valladares, F. (2014). Ecological and evolutionary responses of Mediterranean plants to global change. *Environmental and Experimental Botany* 103, 53-67.
- Matesanz, S., García-Fernández, A., Limón-Yelmo, A., Gómez-Fernández, A., & Escudero, A. (2018). Comparative landscape genetics of gypsum specialists with naturally-patchy distributions reveal their resilience to anthropogenic fragmentation. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 34: 1-9.
- Matesanz, S., Ramos-Muñoz, M., Blanco-Sánchez, M., & Escudero, A. (2020). High differentiation in functional traits but similar phenotypic plasticity in populations of a soil specialist along a climatic gradient. *Annals of Botany*, 125(6), 969-980.
- Mota, J. F., Sánchez-Gómez, P., & Guirado, J. S. (eds.) (2011). *Diversidad vegetal de las yeseras ibéricas. El reto de los archipiélagos edáficos para la biología de la conservación*. ADIFMediterráneo Asesores Consultores, Almería.
- Munguía-Rosas, M. A., Ollerton, J., Parra-Tabla, V., & De-Nova, J. A. (2011). Meta-analysis of phenotypic selection on flowering phenology suggests that early flowering plants are favoured. *Ecology letters*, 14(5), 511-521.
- Nguyen, M. A., Ortega, A. E., Nguyen, K. Q., Kimball, S., Goulden, M. L., & Funk, J. L. (2016). Evolutionary responses of invasive grass species to variation in precipitation and soil nitrogen. *Journal of Ecology*, 104(4), 979-986.
- Niinemets, Ü. (2015). Is there a species spectrum within the world-wide leaf economics spectrum? Major variations in leaf functional traits in the Mediterranean sclerophyll *Quercus ilex*. *New Phytologist* 205:79–96

- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M.S., Cornwell, W.K., Craine, J.M., Gurvich, D.E., Urcelay, C., Veneklaas, E.J., Reich, P.B., Poorter, L., Wright, I.J., Ray, P., Enrico, L., Pausas, J.G., de Vos, A.C., ... Cornelissen, J.H.C. (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 61: 167–234.
- Pérez-Ramos, I. M., Volaire, F., Fattet, M., Blanchard, A., & Roumet, C. (2013). Tradeoffs between functional strategies for resource-use and drought-survival in Mediterranean rangeland species. *Environmental and Experimental Botany*, 87, 126-136.
- Phillips, P. C., & Arnold, S. J. (1989). Visualizing multivariate selection. *Evolution*, 43(6), 1209–1222.
- Poorter, H., & De Jong, R. O. B. (1999). A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *The New Phytologist*, 143(1), 163-176.
- Ramírez-Valiente, J. A., Valladares, F., Delgado Huertas, A., Granados, S., & Aranda, I. (2011). Factors affecting cork oak growth under dry conditions: local adaptation and contrasting additive genetic variance within populations. *Tree Genetics & Genomes*, 7(2), 285-295.
- Ramírez-Valiente, J. A., Solé-Medina, A., Pyhäjärvi, T., Savolainen, O., Cervantes, S., Kesälahti, R., Kujala, S. T.; Kumpula, T., Heer K., Opgenoorth, L., Siebertz, J., Danusevicius, D., Notivol, E., Benavides, R., & Robledo-Arnuncio, J. J. (2021). Selection patterns on early-life phenotypic traits in *Pinus sylvestris* are associated with precipitation and temperature along a climatic gradient in Europe. *New Phytologist*, 229(5), 3009-3025.
- R Development Core Team (2019). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Reich, P. B. (2014). The world-wide ‘fast–slow’ plant economics spectrum: a traits manifesto. *Journal of ecology*, 102(2), 275-301.
- Schenk, J. J. (2013). Evolution of limited seed dispersal ability on gypsum islands. *American Journal of Botany*, 100(9), 1811–1822.

- Sherrard, M. E., & Maherali, H. (2006). The adaptive significance of drought escape in *Avena barbata*, an annual grass. *Evolution*, 60(12), 2478-2489.
- Solé-Medina, A., Robledo-Arnuncio, J. J., & Ramírez-Valiente, J. A. (2022). Multi-trait genetic variation in resource-use strategies and phenotypic plasticity correlates with local climate across the range of a Mediterranean oak (*Quercus faginea*). *New Phytologist*, 234(2), 462-478.
- Stanton, M. L., Roy, B. A., & Thiede, D. A. (2000). Evolution in stressful environments. I. Phenotypic variability, phenotypic selection, and response to selection in five distinct environmental stresses. *Evolution*, 54(1), 93-111.